

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 38/17, 39/395, 31/70,</b> <b>C12N 15/63</b>	<b>A3</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 97/09343</b> (43) Date de publication internationale: 13 mars 1997 (13.03.97)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01340 (22) Date de dépôt international: 2 septembre 1996 (02.09.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/10331                      4 septembre 1995 (04.09.95)      FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TOCQUE, Bruno [FR/FR]; 58, boulevard Saint-Denis, F-94200 Courbevoie (FR). DUBS-POTERSZMAN, Marie-Christine [FR/FR]; 4, rue du Moulin, F-67202 Wolfisheim (FR). WASYLYK, Bohdan [FR/FR]; 2, rue du Romarin, F-67400 Illkirch (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).	(81) Etats désignés: AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i> (88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 29 mai 1997 (29.05.97)	
(54) Title: ANTAGONISTS OF THE ONCOGENIC ACTIVITY OF THE PROTEIN MDM2, AND USE THEREOF IN THE TREATMENT OF CANCERS (54) Titre: ANTAGONISTES DE L'ACTIVITE ONCOGENIQUE DE LA PROTEINE MDM2, ET LEUR UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DES CANCERS (57) Abstract <p>The present invention relates to the utilization of a compound capable of antagonizing at least partially the oncogenic activity of the protein Mdm2 for the preparation of a pharmaceutical composition intended more particularly to a treatment of cancers with no p53 context. It further relates to the viral vector comprising a nucleic acid sequence coding for a compound capable of inhibiting at least partially the oncogenic activity of the protein Mdm2, and to a corresponding pharmaceutical composition.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne l'utilisation d'un composé capable d'antagoniser au moins partiellement l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée plus particulièrement au traitement des cancers à contexte p53 nul. Elle se rapporte en outre à un vecteur viral comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour un composé capable d'inhiber au moins partiellement l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 et à une composition pharmaceutique correspondante.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

**ANTAGONISTES DE L'ACTIVITE ONCOGENIQUE DE LA  
PROTEINE MDM2. ET LEUR UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DES  
CANCERS**

La présente invention concerne une nouvelle méthode de traitement des  
5 pathologies hyperprolifératives (cancers, resténoses, etc..) ainsi que les compositions  
pharmaceutiques correspondantes.

Il est maintenant bien établi qu'une grande majorité des cancers est causée,  
tout au moins en partie, par des anomalies génétiques qui se traduisent soit par la  
surexpression d'un ou plusieurs gènes et/ou l'expression d'un ou de gènes mutés ou  
10 anormaux. Par exemple, l'expression d'oncogènes génère dans la plupart des cas un  
cancer. On entend par oncogène un gène génétiquement affecté et dont le produit  
d'expression perturbe le fonctionnement biologique normal des cellules, initiant ainsi  
un état néoplasique. Un grand nombre d'oncogènes ont à ce jour été identifiés et  
partiellement caractérisés comme notamment les gènes *ras*, *myc*, *fos*, *erb*, *neu*, *raf*,  
15 *src*, *fms*, *jun* et *abl* dont des formes mutées semblent responsables d'un dérèglement  
de la prolifération cellulaire.

Dans un contexte cellulaire normal, la prolifération de ces oncogènes est  
vraisemblablement contrer au moins en partie, par la génération de gènes dits  
suppresseurs de tumeurs comme p53 et Rb. Toutefois, certains phénomènes peuvent  
20 venir perturber ce mécanisme d'autorégulation cellulaire et favoriser alors le  
développement d'un état néoplasique. Un de ces événements consiste en des  
mutations au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs. C'est ainsi que la forme  
mutée par délétion et/ou mutation du gène p53 est impliquée dans le développement  
de la plupart des cancers humains (Baker et coll., Science 244 (1989) 217) et que des  
25 formes inactivées du gène Rb ont été mises en cause dans différentes tumeurs, et  
notamment dans les rétinoblastomes ou dans les cancers mésenchymateux comme les  
ostéosarcomes.

La protéine p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 53kD qui est exprimée dans la plupart des tissus normaux. Elle est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire (Mercer et al. Critic Rev. Eucar. Gene Express, 2, 251, 1992), la régulation transcriptionnelle (Fields et al., Sciences (1990) 249, 1046), la réplication de l'ADN (Wilcoq and Lane, (1991), Nature 349, 4290 et Bargonnetti et al., (1992) Cell 65 1083) et l'induction de l'apoptose (Shaw et al., (1992) P.N.A.S.USA 89, 4495). Ainsi, toute exposition de cellules à des agents capables par exemple d'endommager l'ADN, initie une cascade de signalisation cellulaire qui aboutit à une modification post-transcriptionnelle de la protéine p53 et à l'activation transcriptionnelle par p53 d'un certain nombre de gènes tels gadd45 (growth arrest and DNA damage ) (Kastan et coll. Cell, 71, 587-597,1992 ), p21 WAF/CIP (ElDeiry et coll, Cancer Res., 54, 1169-1174, 1994) ou bien encore mdm2 (mouse double minute) (Barak et coll., EMBO J., 12, 461-468,1993).

De ce qui précède, il ressort clairement que l'élucidation des différentes fonctions biologiques de l'ensemble des protéines impliquées notamment dans cette voie de signalisation cellulaire, de leurs modes de fonctionnement et de leurs caractéristiques est d'un intérêt majeur pour la compréhension de la cancérogénèse et la mise au point de méthodes thérapeutiques efficaces dirigées contre le cancer.

La présente invention s'inscrit précisément dans ce contexte en rapportant une nouvelle fonction de la protéine Mdm2.

La protéine Mdm2 est une phosphoprotéine de poids moléculaire de 90kD, exprimée à partir du gène mdm-2 (murine double minute 2). Ce gène mdm2 a été cloné à l'origine dans une cellule tumorale spontanée BALB/c 3T3 et il a été constaté que sa surexpression augmente fortement le pouvoir tumoral (Cahilly-Snyder et coll .Somat.Cell.Mol.Genet.,13,235-244,1987.; Fakharzadeh et coll, EMBO J. 10,1565-1569,1991). Un complexe Mdm2/p53 a été identifié dans plusieurs lignées cellulaires contenant aussi bien une p53 sauvage que des protéines p53 mutées (Martinez et coll., Genes Dev.,5,151-159, 1991). En outre, il a été montré que Mdm2 inhibe l'activité transcriptionnelle de p53 sur un promoteur comme celui de la

créatine Kinase de muscle indiquant que Mdm2 peut réguler l'activité de p53 (Momand et coll., Cell, 69,1237-1245,1992 ; Oliner et coll. Nature, 362,857-860, 1993).

5        Au vu de l'ensemble de ces résultats, la protéine Mdm2 est donc à ce jour essentiellement reconnue comme un modulateur des activités de p53. En complexant les protéines p53 sauvages ou mutées, elle inhibe leur activité transcriptionnelle et contribue de cette manière à la dérégulation de la prolifération cellulaire. Par conséquent, l'exploitation sur un plan thérapeutique de ces informations consiste majoritairement à rechercher des moyens pour s'opposer à ce blocage par Mdm2 de  
10    la protéine p53.

De manière inattendue, la demanderesse a mis en évidence que cette protéine Mdm2 possédait un caractère oncogénique propre, c'est-à-dire totalement distinct de celui associé à sa forme complexée avec la protéine p53. Plus précisément, la protéine Mdm2 développe des propriétés oncogéniques dans un  
15    contexte p53 nul. Pour appuyer cette découverte à savoir que les propriétés oncogéniques de Mdm-2 sont indépendantes de p53 et en particulier ne résultent pas de l'inhibition de l'activité transactivatrice de p53 sauvage, nous avons montré qu'un mutant de p53 (p53 (14-19) ; Lin et al., Genes Dev., 1994, 8, 1235-1246) qui a conservé ses propriétés transactivatrices mais qui n'interagit plus avec Mdm-2 est  
20    incapable de bloquer les propriétés oncogéniques de Mdm-2. Il est également montré que Mdm-2 et en particulier le domaine 1-134 de Mdm-2 est capable de débloquent un arrêt du cycle cellulaire en G1 induit par la surexpression de p107. Mdm-2 s'avère donc être un régulateur important de facteurs impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, autres que p53.

25        La présente invention résulte en partie de la mise en évidence que la séquence protéique 1-134 de la séquence identifiée en SEQ ID N°1, de la protéine Mdm2 est suffisante pour traduire le potentiel oncogénique de ladite protéine.

Elle résulte également de la mise en évidence qu'il est possible d'affecter ce caractère oncogénique de la protéine Mdm2 en utilisant des composés capables d'interagir avec elle. La présente invention décrit également des systèmes particulièrement efficaces permettant la délivrance in vivo, directement dans les tumeurs, de tels composés et ainsi de lutter contre le développement des cancers. La présente invention offre ainsi une nouvelle approche particulièrement efficace pour le traitement des tumeurs en particulier à contexte p53 nul telles que les cancers suivants les adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du poumon, les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, etc. . .

Un premier objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé capable d'antagoniser au moins partiellement l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers à contexte p53 nul.

Au sens de l'invention, on entend par cancer à contexte p53 nul, un cancer où p53 serait incapable d'exercer ses fonctions de gène suppresseur de tumeur par toute modification ou tout mécanisme autre que la fixation de Mdm-2 sur p53, cette fixation empêchant p53 de jouer son rôle de suppresseur de tumeur et permettant aux cellules d'échapper à une croissance régulée par p53. On peut citer de façon non exhaustive parmi ces modifications ou mécanismes bloquant l'activité de suppresseur de tumeur de p53, par exemple, des altérations génétiques du gène p53 (mutations ponctuelles, délétions, etc), l'interaction avec d'autres protéines que Mdm-2, la dégradation protéolytique très rapide de la protéine p53 liée à la présence de la protéine E6 des virus des papillomes humains à haut risque tels que HPV-16 et HPV-18, etc.

Au sens de l'invention, l'inhibition de l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 peut être achevée selon deux méthodes.

Elle est préférentiellement accomplie en intervenant directement au niveau du domaine 1-134 de celle-ci. C'est ainsi que toute protéine capable de se lier à ce domaine aura un rôle antagoniste sur les propriétés oncogéniques de Mdm2.

Toutefois, cet effet inhibiteur peut également être atteint via l'interaction  
5 d'un composé avec un domaine voisin, comme par exemple le domaine 135-491 de mdm2, représenté sur la séquence SEQ ID N°1 ou sa séquence C terminale représentée sur la séquence SEQ ID N°1. En conséquence, la présente invention vise en outre l'utilisation de tout composé qui, bien que n'interagissant pas directement avec ce domaine, est néanmoins capable d'en affecter le caractère oncogénique.

10 Selon un mode particulier, la présente invention vise l'utilisation d'un composé capable de se lier au niveau du domaine 1-134 de la séquence représentée en SEQ ID N° 1 de la protéine Mdm2 en vue de préparer une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers à contexte p53 nul.

A titre de composé susceptible d'interagir directement au niveau du domaine  
15 1-134, de la protéine Mdm2, on peut citer plus particulièrement les scFv dirigés spécifiquement contre ce domaine.

Les ScFv sont des molécules ayant des propriété de liaison comparables à celles d'un anticorps et actives intracellulairement. Il s'agit plus particulièrement de molécules constituées d'un peptide correspondant au site de liaison de la région  
20 variable de la chaîne légère d'un anticorps relié par un linker peptidique à un peptide correspondant au site de liaison de la région variable de la chaîne lourde d'un anticorps. Il a été montré par la demanderesse que de tels ScFv pouvaient être produits in vivo par transfert de gène (Cf demande WO 94/29446).

Il peut également s'agir de peptides ou de protéines déjà connus pour leur  
25 aptitude à se lier spécifiquement avec le domaine 1-134 de Mdm2 comme par exemple tout ou partie du domaine de liaison de la protéine p53 avec la SEQ ID N°1 et plus particulièrement tout ou partie d'un des peptides 1-52, 1-41 et 6-41 de la séquence de p53 représentée en SEQ ID N°2, (Oliner et al., Nature, 1993, 362, 857-860) ou plus

5 simplement tout ou partie du peptide 16-25 cartographié plus précisément (Lane et al., Phil. Trans. R. Soc. London B., 1995, 347, 83-87), ou même les peptides 18-23 des p53 humaine ou murine, ou encore des peptides dérivés proches de ceux précédemment cités dans lesquels les résidus critiques pour l'interaction avec Mdm-2 auront été conservés (Picksley et al., Oncogene, 1994, 9, 2523-2529).

10 Il peut également être mis en oeuvre selon l'invention des composés de se lier à des domaines voisins du domaine 1-134 de Mdm2 représenté en SEQ ID N°1 et affectant de part cette liaison l'activité oncogénique de la protéine Mdm2. A ce titre, on peut citer ceux interagissant au niveau du domaine C terminal de ladite protéine comme par exemple les facteurs transcriptionnels TFII, TBP, et TaF250 de même que les protéines interagissant au niveau du domaine 135-491 de Mdm2 représenté en SEQ ID N°1 comme par exemple les protéines L5 (protéine ribosomale) et Rb (protéine rétinoblastome) et le facteur transcriptionnel E2F (régulé par Rb).

15 Un autre objet de la présente invention vise également l'utilisation de scFV dirigés spécifiquement contre ce domaine 1-134 de la séquence représentée en SEQ ID N° 1 de la protéine Mdm2 en vue de préparer une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.

20 Au sens de l'invention, il est entendu que l'ensemble des interactions citées ci-dessus affectent de manière conséquente le caractère oncogénique de Mdm2. En outre, ces protéines peuvent être utilisées, en tout ou partie, dans la mesure où il est mis en oeuvre leur partie active vis-à-vis d'un des domaines de liaison avec la protéine Mdm2 et que cette interaction conduit à une affectation du caractère oncogénique de celle-ci.

25 Dans le cadre de la présente invention, ces composés peuvent être utilisés tels quels ou, avantageusement, sous forme de constructions génétiques permettant leur expression in vivo.

Un mode de réalisation particulièrement avantageux de la présente invention consiste à mettre en oeuvre une séquence nucléique codant pour un composé capable



d'antagoniser au moins partiellement l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers à contexte p53 nul.

Dans cette perspective, les acides nucléiques utilisés dans le cadre de l'invention peuvent être de différents types. Il s'agit de manière préférentielle :

- d'acides nucléiques antisens,
- d'oligoribonucléotides capables de fixer directement l'un des domaines de la protéine Mdm2 et d'inhiber son activité oncogénique (oligonucléotide ligand),
- d'acides nucléiques codant en tout ou partie pour des peptides ou protéines capables de s'oligomériser avec l'un des domaines de Mdm2 et d'inhiber son activité oncogénique,
- d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires (par exemple des fragments variables à chaîne unique issu d'un anticorps) dirigés contre le domaine 1-134 de la séquence SEQ ID N°1 de la protéine Mdm2.

Selon un mode particulier de la présente invention, l'acide nucléique est un acide nucléique antisens. Cet antisens est un ADN codant pour un ARN complémentaire de l'acide nucléique codant pour la protéine Mdm2 et capable de bloquer sa transcription et/ou sa traduction (ARN antisens) ou un ribozyme.

Plus récemment, un nouveau type d'acides nucléiques capables de réguler l'expression de gènes-cible a été mis en évidence. Ces acides nucléiques ne s'hybrident pas avec les ARNm cellulaires, mais directement avec l'ADN génomique en double-brin. Cette nouvelle approche repose sur la mise en évidence que certains acides nucléiques sont capables d'interagir spécifiquement dans le grand sillon de la double-hélice d'ADN pour former localement des triple-hélices, conduisant à une inhibition de la transcription de gènes-cible. Ces acides nucléiques reconnaissent sélectivement la double-hélice d'ADN au niveau de séquences oligopurine.oligopyrimidine, c'est-à-dire au niveau de régions possédant une séquence oligopurique sur un brin et une séquence oligopyrimidique sur le brin complémentaire, et y forment localement une triple-hélice. Les bases du troisième brin (l'oligonucléotide) forment des liaisons

hydrogène (liaisons Hoogsteen ou Hoogsteen inverse) avec les purines des paires de bases Watson-Crick. De tels acides nucléiques ont notamment été décrits par le Pr. Hélène dans Anti-Cancer drug design 6 (1991) 569.

5 Les acides nucléiques antisens selon la présente invention peuvent être des séquences d'ADN codant pour des ARN antisens ou pour des ribozymes. Les ARN antisens ainsi produits peuvent interagir avec un ARNm ou un ADN génomique cible et former avec celui-ci des doubles ou des triples hélices. Il peut également s'agir de séquences (oligonucléotides) antisens, éventuellement modifiés chimiquement, capables d'interagir directement avec le gène ou l'ARN cible.

10 Toujours selon un mode préféré de mise en oeuvre de la présente invention, l'acide nucléique est un oligonucléotide antisens tel que défini précédemment, éventuellement modifié chimiquement. Il peut s'agir en particulier d'oligonucléotides dont le squelette phosphodiester a été modifié chimiquement, tels que par exemple les oligonucléotides phosphonates, phosphotriesters, phosphoramidates et  
15 phosphorothioates qui sont décrits, par exemple, dans la demande de brevet WO94/08003. Il peut également s'agir d'oligonucléotides alpha, ou d'oligonucléotides conjugués à des agents tels que des composés acrylants.

Au sens de la présente invention, on entend par oligonucléotide ligand, un oligoribonucléotide ou un oligodéoxyribonucléotide capable de se fixer  
20 spécifiquement à la protéine Mdm-2 afin d'inhiber sa fonction oncogénique. De tels nucléotides peuvent par exemple être mis en évidence par des techniques d'"évolution in vitro" comme par exemple la technique SELEX (Edgington, Bio/technology, 1992, 10, 137-140 ; Brevets US 5,270,163 et WO 91/19813).

Plus généralement, ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine,  
25 animale, végétale, bactérienne, virale, synthétique, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Comme indiqué plus loin, ils peuvent par ailleurs être incorporés dans des vecteurs, tels que des vecteurs plasmidiques, viraux ou chimiques. Ils peuvent également être administrés tels quels, sous forme d'ADN nu selon la technique décrite dans la demande WO 90/11092 ou sous forme complexée, par exemple avec  
5 du DEAE-dextran (Pagano et al., J.Virol. 1 (1967) 891), avec des protéines nucléaires (Kaneda et al., Science 243 (1989) 375), avec des lipides ou polymères cationiques (Felgner et al., PNAS 84 (1987) 7413), sous forme de liposomes (Fraleigh et al., J.Biol.Chem. 255 (1980) 10431), etc.

Préférentiellement, la séquence utilisée dans le cadre de l'invention fait  
10 partie d'un vecteur. L'emploi d'un tel vecteur permet en effet d'améliorer l'administration de l'acide nucléique dans les cellules à traiter, et également d'augmenter sa stabilité dans lesdites cellules, ce qui permet d'obtenir un effet thérapeutique durable. De plus, il est possible d'introduire plusieurs séquences d'acide nucléique dans un même vecteur, ce qui augmente également l'efficacité du  
15 traitement.

Le vecteur utilisé peut être d'origine diverses, dès lors qu'il est capable de transformer les cellules animales, de préférence les cellules cancéreuses humaines. Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, on utilise un vecteur viral, qui peut être choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus, les virus adéno-associés  
20 (AAV) ou le virus de l'herpès.

A cet égard, la présente invention a également pour objet tout vecteur viral comprenant, inséré dans son génome, un acide nucléique codant pour un composé capable d'antagoniser au moins partiellement le caractère oncogénique de la protéine Mdm2.

25 Plus particulièrement, elle concerne tout virus recombinant comprenant une séquence d'acides nucléiques codant pour un composé capable de se lier à la protéine Mdm2 de manière à affecter son potentiel oncogénique. Dans ce contexte, la

séquence d'acides nucléiques peut coder pour l'un des peptides, protéines ou facteurs transcriptionnels précédemment identifiés.

Plus préférentiellement, cette séquence d'acides nucléiques code pour un scFv ou un peptide capable d'interagir au niveau du domaine 1-134 (SEQ ID N°1) de la protéine Mdm2.

Avantageusement, les virus utilisés dans le cadre de l'invention sont préférentiellement défectifs, c'est-à-dire qu'ils sont incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule infectée. Généralement, le génome des virus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est donc dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence codant pour le composé possédant un rôle antagoniste sur les propriétés oncogéniques de la protéine Mdm2. Préférentiellement, le virus défectif conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsidation des particules virales.

S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande FR 93 05954). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et la séquence codant pour le modulateur des calpaïnes. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de l'invention, le gène E1 et au moins l'un des gènes E2, E4, L1-L5 sont non fonctionnels. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573 ; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN codant pour l'inhibiteur des ETS. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent,

de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend  
5 environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsulation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap  
10 codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap  
15 sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant la séquence codant pour  
20 l'inhibiteur des ETS bordé de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsulation (gènes rep et cap) d'AAV. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield  
25 et al., New Biologist 3 (1991) 203 ; EP 453242, EP 178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235 ; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence

d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus" ; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus") ; le SNV ("spleen necrosis virus") ; le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants comportant une séquence d'intérêt, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et ladite séquence d'intérêt est généralement construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US 4,861,719) ; la lignée PsiCRIP (WO 90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO 89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Avantageusement, dans les vecteurs de l'invention, la séquence codant pour le composé possédant des propriétés antagonistes sur le caractère oncogénique de Mdm2 est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans les cellules tumorales. Préférentiellement, il s'agit de signaux d'expression hétérologues, c'est-à-dire de signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression de l'inhibiteur. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter. De

même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris du virus utilisé. A cet égard, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP, CMV, LTR-RSV, etc. En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une  
5 expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules tumorales, de manière à ce que la séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule tumorale.

Dans un mode particulier de réalisation, l'invention concerne un virus  
10 recombinant défectif comprenant une séquence d'ADNc codant pour un composé possédant des propriétés antagonistes sur le caractère oncogénique de Mdm2 sous le contrôle d'un promoteur viral, choisi de préférence parmi le LTR-RSV et le promoteur CMV.

Toujours dans un mode préféré, l'invention concerne un virus recombinant  
15 défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour un composé possédant des propriétés antagonistes sur le caractère oncogénique de Mdm2 sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression majoritaire dans les cellules tumorales.

L'expression est considérée comme majoritaire au sens de l'invention lorsque, même si une expression résiduelle est observée dans d'autres types  
20 cellulaires, les niveaux d'expression sont supérieurs dans les cellules tumorales.

La présente invention s'étend également à l'utilisation d'une séquence nucléique codant pour des anticorps intracellulaires ou encore scFV, dirigés contre le domaine 1-134 de la séquence de la protéine Mdm2 représentée en SEQ ID N°1 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée de manière générale au  
25 traitement du cancer.

Elle concerne également toute composition pharmaceutique comprenant un composé capable d'inhiber l'activité oncogénique de la protéine Mdm2, ou une séquence d'acides nucléiques codant pour un tel composé. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention cette composition comprend un ou plusieurs virus



recombinants défectifs tels que décrits précédemment. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être formulées en vue d'administrations par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc. De préférence, les compositions pharmaceutiques de l'invention contiennent un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour une formulation injectable, notamment pour une injection directe dans la tumeur du patient. Il peut s'agir en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. L'injection directe dans la tumeur du patient est avantageuse car elle permet de concentrer l'effet thérapeutique au niveau des tissus affectés.

Les doses de virus recombinant défectif utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du vecteur viral, du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu/ml, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature. Concernant les rétrovirus, les compositions selon l'invention peuvent comporter directement les cellules productrices, en vue de leur implantation.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont particulièrement avantageuses pour neutraliser l'activité oncogénique des protéines Mdm2 et de ce fait pour moduler la prolifération de certains types cellulaires.

En particulier, ces compositions pharmaceutiques sont appropriées au traitement de cancers possédant un p53 nul comme par exemple les cancers suivants: les adénocarcinomes du colon, les cancers de la thyroïde, les carcinomes du poulmon,

les leucémies myéloïdes, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers du poumon, les cancers gastriques, les cancers de l'oesophage, les lymphômes B, les cancers ovariens, les cancers de la vessie, les glioblastomes, etc.

La présente invention est avantageusement utilisée in vivo pour la destruction de cellules en hyperprolifération (i.e. en prolifération anormale). Elle est ainsi applicable à la destruction des cellules tumorales ou des cellules de muscle lisse de la paroi vasculaire (resténose).

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples et figures qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Figure 1 : Représentation des protéines Mdm-2 de A à F.

Figure 2 : Graphe de la transfection de cellules Saos-2 avec des plasmides exprimant diverses protéines Mdm-2

Figure 3 : Représentation schématique de l'inhibition des propriétés transformantes de Mdm2 par différents p53.

Figure 4 : Effet d'une surexpression Mdm2 sur le cycle cellulaire.

Figure 5 : Effet d'une surexpression Mdm2 sur le cycle cellulaire.

#### Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

- 5 Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

- 15 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant. L'amplification d'ADN génomique est réalisée plus particulièrement dans les conditions suivantes : 5 minutes à 100°C, 30 cycles d'une minute à 95°C, 2 minutes à 58°C puis 3 minutes à 72°C au moyen de sondes appropriées. Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

## 25 Matériels et Méthodes :

### 1.Construction utilisées :

- le plasmide pBKCMV est commercialisée par Stratagène et contient le gène de résistance à la néomycine.

- les plasmides pC53C1N3 et p53-4.2. N3 codant respectivement pour p53 sauvage et pour p53 R273H proviennent de A. Levine (Hinds et. al., Cell Growth and Diff. (1990), 1, 571).
- le plasmide pBKp53 (R273H) contient le minigène humain p53. Il a été  
5 obtenu à partir de pC53-4.2. N3.
- le plasmide pBKMdm2 a été obtenu par clonage dans pBKCMV d'une cassette codante consistant en la région non traduite de l'extrémité de la séquence codant pour la  $\beta$  globine suivie de la séquence codant pour mdm2.
- le plasmide pGKhygro exprime le gène de résistance à l'hygromycine  
10 (Nature (1990) 348, 649-651).
- le plasmide pCMVNeoBam permettant l'expression du gène de résistance à la néomycine (Hinds et.al. (1990) Cell. Growth and Diff., 1, 571-580).
- les plasmides pCMVp107 et pCMVCD20 permettant l'expression de la protéine p107 et du marqueur de surface CD20 (Zhu et.al. (1993) Genes and  
15 Development, 7, 1111-1125).
- les plasmides pCMVE2F-4 et pCMVE2F-5 permettant l'expression des protéines E2F-4 et E2F-5 (Sardet et.al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sc., 92, 2403-2407).
- les plasmides pLexA, pLexA(6-41), pLexA(16-25) permettant l'expression du domaine de fixation à l'ADN de LexA (aa 1 à 87) libre ou fusionné en phase avec  
20 p53(6-41) ou p53 (16-25). pLexA(6-41) et pLexA(16-25) ont été obtenus à partir du plasmide pLexApolyII construit au LGME (Strasbourg).
- les plasmides d'expression eucaryote de p107 : p107(385-1068), p107(1-781) et p107(781-1068) (Zhu et al., EMBO J. 14 (1995) 1904).
- le plasmide pSGK1HAp107 permet l'expression in vitro et in vivo de  
25 p107. p107 est dans le contexte d'une séquence Kozak et l'épitope HA est exprimé en fusion à l'extrémité C-terminale de p107.

- les plasmides pBC-MDM2 et pBC-MDM2(1-134) ont été obtenus par clonage de MDM2 et MDM2(1-134) dans pBC (Chatton et al., Biotechniques 18 (1995) 142).

- les plasmides pGex-MDM2 et pGex-MDM2(1-177) ont été obtenus par  
5 clonage de MDM2 et MDM2(1-177) dans pGex.

## 2.Méthode :

L'expression de p53 est déterminée par Western Blotting sur l'extrait cellulaire entier à l'aide d'un anticorps monoclonal D01.

L'expression de l'ARMm codant pour la protéine Mdm2 est estimée par RT-  
10 PCR semi-quantitative.

L'absence de contamination de l'ADN est vérifiée par PCR.

### Exemple 1 : Mise en évidence des propriétés transformantes de mdm2.

Des cellules Saos-2 sont transfectées avec soit un plasmide pBKMDM2, un plasmide témoin pBKp53 (R273H) ou un plasmide témoin en p53 négatif pBKCMV,  
15 puis sélectionnées pour la résistance à la Geneticine 418(G418).

Dans un premier essai, des clones sont sélectionnés individuellement et propagé alors que dans les 2 autres essais, les clones non isolés sont mis en culture dans un milieu agar soft.

Pour cela,  $10^4$  cellules sontensemencées en duplicata dans 0,375 % de soft  
20 agar. Après 24 heures, on détermine le nombre total de colonies avec plus de 50 cellules ainsi que le nombre de cellules par colonie (taille des colonies). Chaque valeur donnée correspond à une moyenne de quatre expériences réalisées en double. Les résultats obtenus sont présentés en tableau I. Les clones dans l'essai n°1 correspondants à mdm2 sont identifiés sous M1 à M6, ceux de p53 (R273H) sous  
25 p53-1 à p53-6 et ceux du témoin sous Co1 à Co5) .

Comme attendu, Co1 et Co4 n'expriment pas le mdm2 transfecté et Co 1-3 la protéine p53.

			CROISSANCE SUR MILIEU SOFT AGAR COLONIES (TAILLE)	EXPRESSION	
				MDM2	P53
<b>EXPERIENCE 1</b> (clones isolés)	<b>MDM2</b>	M1	634 (100-600)	+	ND
		M2	594 (100-600)	++	ND
		M3	460 (100-600)	+	ND
		M4	310 (50-500)	++	ND
		M5	57 (50-200)	+/-	ND
		M6	23 (50)	+	ND
	<b>Contrôle</b>	Co1	97 (50-200)	-	-
		Co2	68 (50-200)	ND	-
		Co3	35 (50-100)	ND	-
		Co4	11 (50)	-	ND
		Co5	4 (50)	ND	ND
	<b>p53R (273)H</b>	p53-1	190 (50-600)	ND	+++
		p53-2	137 (50-300)	ND	++++
		p53-3	88 (50-200)	ND	+++
		p53-4	53 (50-200)	ND	+++
		p53-5	47 (50-200)	ND	++
		p53-6	38 (50-100)	ND	+
<b>EXPERIENCE 2</b>	<b>MDM2</b>	M-P1	395 (100-1000)	++	ND
	<b>Contrôle</b>	Co-P1	21 (50-200)	ND	ND
		Co-P2	18 (50-200)	ND	ND
<b>EXPERIENCE 3</b>	<b>MDM2</b>	M-P1	255 (50-300)	ND	ND
		M-P2	220 (50-300)	ND	ND
	<b>Contrôle</b>	Co-P1	110 (50-200)	ND	ND
		Co-P2	110 (50-200)	ND	ND
		Co-P3	100 (50-200)	ND	ND
		Co-P4	75 (50-200)	ND	ND

TABLEAU I

Exemple 2: La région N-terminale de Mdm-2 (1-134) séq ID N°1 est nécessaire et suffisante pour stimuler la croissance en agar soft des cellules Saos-2.

Des cellules Saos-2 sont transfectées avec soit des plasmides pBKCMV qui expriment à la fois la résistance neo et les protéines mdm-2 de A à F décrites dans la figure 1, soit un plasmide témoin pBKCMV vide, puis sélectionnées pour la résistance à la G418. Les cellules survivantes sont regroupées, amplifiées puis testées pour la formation de colonies en agar soft. Les résultats de la figure 2 sont exprimés en nombre de clones formés en agar soft relatif à celui avec mdm-2 entier (A). Ces résultats sont issus de deux expériences représentatives de transfection indépendantes dans lesquelles entre 3 et 7 pools de cellules différents ont été testés, suivant la construction. Ils montrent clairement que le domaine N-terminal de mdm-2 possède des propriétés oncogéniques. La construction la plus efficace correspond à la protéine entière.

Exemple 3: Réversion des propriétés oncogéniques de Mdm-2 par la p53 sauvage, des mutants de p53 et des fragments de p53.

Un lot de cellules Saos-2 transformées par Mdm-2 est co-transfecté avec le plasmide pGKhygro et soit pC53C1N3 (p53) pC53-4.2N3 p53(R(273)H), p53 (1-52), pLexA(6-41), pLexA(16-25), pLexA, p53(L14Q,F19S), p53(L22Q,W23S), soit pCMVNeoBam, puis sélectionnées pour la résistance à l'hygromycine en présence de G418. 10 000 cellules provenant de 3 à 5 pools indépendants de cellules résistantes sont ensemencées en duplicate en agar soft (0,375 %). Après 25 jours de culture, les colonies contenant au moins 50 cellules sont comptées. La figure 3 présente les résultats d'une expérience représentative et donne une représentation schématique des différentes p53 testées pour inhiber les propriétés transformantes de Mdm-2. Il ressort de cette expérience que seules les constructions permettant l'expression de protéines capables de se lier à la protéine mdm-2, en l'occurrence p53, p53 R273H, p53(1-52), LexA(6-41), LexA(16-25) inhibent les propriétés oncogéniques de Mdm-2. En revanche, les double mutants dont il est démontré qu'ils ont perdu la capacité de liaison à mdm-2 (Lin et al., Gene Dev., 1994, 8, 1235-1246) n'ont pas d'effet

inhibiteur. Le fait que le mutant p53(14-19) qui a conservé les propriétés transactivatrices de la p53 sauvage n'inhibe pas la transformation par Mdm-2 confirment que les propriétés oncogéniques de Mdm-2 sont indépendantes de l'inhibition par Mdm-2 des propriétés transactivatrices de p53.

5 Exemple 4: Mdm-2 inhibe le blocage en G1 du cycle cellulaire induit par p107 dans les cellules Saos-2.

Des cellules Saos-2 sont co-transfectées avec trois types de plasmides, (i) un plasmide pour l'expression de CD-20 (pCMVCD20, 2 µg, codant pour le marqueur de surface cellulaire CD-20), (ii) un plasmide (9 µg) d'expression de type CMV  
10 (promoteur du cytomegalovirus) sans séquence codante ou codant pour Mdm-2 (PBKCMVMdm2), pour le domaine 1-134 de Mdm-2 (PBKCMVMdm2(1-134)), E2F-4 ou E2F-5 (pCMVE2F-4, pCMVE2F-5), et (iii) un vecteur d'expression de p107 (pCMVp107, 9 µg). Les cellules sont ensuite traitées pour l'analyse par FACScan comme décrit par Zhu et al., Gene Dev., 1993, 7, 1111-1125). Les résultats  
15 d'une expérience représentative sont représentées dans la figure 4. Il démontre clairement que en l'absence de p107 surexprimé, l'expression de Mdm-2 ou de son domaine 1-134 n'ont pas d'effet sur le cycle cellulaire. En revanche, l'expression de Mdm-2 et, avec une efficacité, son domaine 1-134 sont capables de lever l'arrêt du cycle cellulaire en G1 induit par p107. Cet exemple démontre clairement que Mdm-2  
20 n'est pas qu'un inhibiteur de l'activité transactivatrice de p53, mais aussi un régulateur positif du cycle cellulaire capable d'inhiber des facteurs impliqués dans le contrôle de celui-ci.

Dans une expérience similaire, des cellules Saos-2 sont co-transfectées avec 1 µg de p107(385-1068), 8 µg de pCMVNéoBam, 1 µg de pXJMDM2, 8 µg de  
25 pXJ41 et 2 µg de pCMVCD20. Les résultats d'une expérience représentative sont indiqués sur la figure 5. Ils montrent que l'expression de MDM2 peut lever le blocage en G1 induit par p107 et par le mutant de délétion p107(385-1068) qui est capable d'interagir avec MDM2.



**Exemple 5: MDM2 interagit in vitro et in vivo avec p107**

Cet exemple démontre une interaction physique entre MDM2 et p107, in vitro comme in vivo. Ces résultats sont corrélés avec l'activité de MDM2 au niveau du cycle cellulaire (exemple 4).

5                    5.1. In vitro

p107 marqué au S35 in vitro est mis en contact avec de la protéine GST-MDM2 (vecteur pGex- MDM2) ou GST- MDM2(1-177) (vecteur pGex- MDM2(1-177)) immobilisée sur des billes glutathione sépharose. P107 liée à MDM2 est révélée après gel de polyacrylamide par autoradiographie. Les résultats obtenus sont présentés dans  
10 le Tableau II ci-après.

5.2. In vivo

Des cellules Cos sont cotransfectées avec un plasmide pBC- MDM2 ou pBC- MDM2(1-134) qui expriment une protéine de fusion GST- MDM2 ou GST- MDM2(1-134), avec un plasmide d'expression de p107 ou d'un mutant de p107. Les  
15 complexes de protéines GST- MDM2-p107 provenant des extraits cellulaires totaux sont isolés sur des billes glutathione sépharose et les protéines p107 sont révélées par Western blot avec un anticorps polyclonal anti-p107 (Santa Cruz p107-C18). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II ci-après.

	p107	p107(385-1068)	p107(1-781)	p107(385-1068)
<b>In Vivo</b>				
GST- MDM2	+	+	+	+
GST- MDM2(1-134)	+	nd	nd	nd
<b>In Vitro</b>				
GST- MDM2	+	nd	nd	nd
GST- MDM2(1-177)	+	nd	nd	nd

Les résultats démontrent qu'il y a une interaction protéine-protéine entre MDM2 et p107 in vitro, mais aussi dans la cellule. La région de MDM2 nécessaire pour la transformation cellulaire (1-134) est la région qui interagit avec p107. Cette région a été localisée comme étant située plus précisément dans une partie du "pocket domain", région "A" et le "spacer".

5

## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## 5 (i) DEPOSANT:

(A) NOM: RHONE POULENC RORER S.A.

(B) RUE: 20, Avenue Raymond Aron

(C) VILLE: ANTONY

(E) PAYS: FRANCE

10 (F) CODE POSTAL: 92165

(G) TELEPHONE: 40.91.69.22

(H) TELECOPIE: (1) 40.91.72.96

## (ii) DEPOSANT:

15 (A) NOM: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE  
MEDICALE (INSERM)

(B) RUE: 101, Rue de Tolbiac

(C) VILLE: PARIS Cedex 13

(E) PAYS: FRANCE

20 (F) CODE POSTAL: 75654

(G) TELEPHONE: 44.23.60.61.

(H) TELECOPIE: 45.85.68.56.

25 (ii) TITRE DE L' INVENTION: ANTAGONISTES DE L'ACTIVITE  
ONCOGENIQUE DE LA PROTEINE MDM2 ET LEUR UTILISATION DANS LE  
TRAITEMENT DES CANCERS

## (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 2

## 30 (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

(A) TYPE DE SUPPORT: Tape

(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible

(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS

(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

35

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1476 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

10 (iv) ANTI-SENS: NON

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 1..1476

15

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

ATG TGC AAT ACC AAC ATG TCT GTA CCT ACT GAT GGT GCT GTA ACC ACC 48

Met Cys Asn Thr Asn Met Ser Val Pro Thr Asp Gly Ala Val Thr Thr

20 1 5 10 15

TCA CAG ATT CCA GCT TCG GAA CAA GAG ACC CTG GTT AGA CCA AAG CCA 96

Ser Gln Ile Pro Ala Ser Glu Gln Glu Thr Leu Val Arg Pro Lys Pro

20 25 30

25

TTG CTT TTG AAG TTA TTA AAG TCT GTT GGT GCA CAA AAA GAC ACT TAT 144

Leu Leu Leu Lys Leu Leu Lys Ser Val Gly Ala Gln Lys Asp Thr Tyr

35 40 45

	ACT ATG AAA GAG GTT CTT TTT TAT CTT GGC CAG TAT ATT ATG ACT AAA	192
	Thr Met Lys Glu Val Leu Phe Tyr Leu Gly Gln Tyr Ile Met Thr Lys	
	50 55 60	
5	CGA TTA TAT GAT GAG AAG CAA CAA CAT ATT GTA TAT TGT TCA AAT GAT	240
	Arg Leu Tyr Asp Glu Lys Gln Gln His Ile Val Tyr Cys Ser Asn Asp	
	65 70 75 80	
	CTT CTA GGA GAT TTG TTT GGC GTG CCA AGC TTC TCT GTG AAA GAG CAC	288
10	Leu Leu Gly Asp Leu Phe Gly Val Pro Ser Phe Ser Val Lys Glu His	
	85 90 95	
	AGG AAA ATA TAT ACC ATG ATC TAC AGG AAC TTG GTA GTA GTC AAT CAG	336
	Arg Lys Ile Tyr Thr Met Ile Tyr Arg Asn Leu Val Val Val Asn Gln	
15	100 105 110	
	CAG GAA TCA TCG GAC TCA GGT ACA TCT GTG AGT GAG AAC AGG TGT CAC	384
	Gln Glu Ser Ser Asp Ser Gly Thr Ser Val Ser Glu Asn Arg Cys His	
	115 120 125	
20		
	CTT GAA GGT GGG AGT GAT CAA AAG GAC CTT GTA CAA GAG CTT CAG GAA	432
	Leu Glu Gly Gly Ser Asp Gln Lys Asp Leu Val Gln Glu Leu Gln Glu	
	130 135 140	
25	GAG AAA CCT TCA TCT TCA CAT TTG GTT TCT AGA CCA TCT ACC TCA TCT	480
	Glu Lys Pro Ser Ser Ser His Leu Val Ser Arg Pro Ser Thr Ser Ser	
	145 150 155 160	
	AGA AGG AGA GCA ATT AGT GAG ACA GAA GAA AAT TCA GAT GAA TTA TCT	528

	Arg Arg Arg Ala Ile Ser Glu Thr Glu Glu Asn Ser Asp Glu Leu Ser	
	165	175
	GGT GAA CGA CAA AGA AAA CGC CAC AAA TCT GAT AGT ATT TCC CTT TCC	576
5	Gly Glu Arg Gln Arg Lys Arg His Lys Ser Asp Ser Ile Ser Leu Ser	
	180	190
	TTT GAT GAA AGC CTG GCT CTG TGT GTA ATA AGG GAG ATA TGT TGT GAA	624
	Phe Asp Glu Ser Leu Ala Leu Cys Val Ile Arg Glu Ile Cys Cys Glu	
10	195	205
	AGA AGC AGT AGC AGT GAA TCT ACA GGG ACG CCA TCG AAT CCG GAT CTT	672
	Arg Ser Ser Ser Ser Glu Ser Thr Gly Thr Pro Ser Asn Pro Asp Leu	
	210	220
15		
	GAT GCT GGT GTA AGT GAA CAT TCA GGT GAT TGG TTG GAT CAG GAT TCA	720
	Asp Ala Gly Val Ser Glu His Ser Gly Asp Trp Leu Asp Gln Asp Ser	
	225	240
	230	235
20	GTT TCA GAT CAG TTT AGT GTA GAA TTT GAA GTT GAA TCT CTC GAC TCA	768
	Val Ser Asp Gln Phe Ser Val Glu Phe Glu Val Glu Ser Leu Asp Ser	
	245	255
	250	
	GAA GAT TAT AGC CTT AGT GAA GAA GGA CAA GAA CTC TCA GAT GAA GAT	816
25	Glu Asp Tyr Ser Leu Ser Glu Glu Gly Gln Glu Leu Ser Asp Glu Asp	
	260	270
	265	
	GAT GAG GTA TAT CAA GTT ACT GTG TAT CAG GCA GGG GAG AGT GAT ACA	864
	Asp Glu Val Tyr Gln Val Thr Val Tyr Gln Ala Gly Glu Ser Asp Thr	

	275	280	285	
	GAT TCA TTT GAA GAA GAT CCT GAA ATT TCC TTA GCT GAC TAT TGG AAA			912
	Asp Ser Phe Glu Glu Asp Pro Glu Ile Ser Leu Ala Asp Tyr Trp Lys			
5	290	295	300	
	TGC ACT TCA TGC AAT GAA ATG AAT CCC CCC CTT CCA TCA CAT TGC AAC			960
	Cys Thr Ser Cys Asn Glu Met Asn Pro Pro Leu Pro Ser His Cys Asn			
	305	310	315	320
10				
	AGA TGT TGG GCC CTT CGT GAG AAT TGG CTT CCT GAA GAT AAA GGG AAA			1008
	Arg Cys Trp Ala Leu Arg Glu Asn Trp Leu Pro Glu Asp Lys Gly Lys			
		325	330	335
15				
	GAT AAA GGG GAA ATC TCT GAG AAA GCC AAA CTG GAA AAC TCA ACA CAA			1056
	Asp Lys Gly Glu Ile Ser Glu Lys Ala Lys Leu Glu Asn Ser Thr Gln			
		340	345	350
	GCT GAA GAG GGC TTT GAT GTT CCT GAT TGT AAA AAA ACT ATA GTG AAT			1104
20	Ala Glu Glu Gly Phe Asp Val Pro Asp Cys Lys Lys Thr Ile Val Asn			
		355	360	365
	GAT TCC AGA GAG TCA TGT GTT GAG GAA AAT GAT GAT AAA ATT ACA CAA			1152
	Asp Ser Arg Glu Ser Cys Val Glu Glu Asn Asp Asp Lys Ile Thr Gln			
25	370	375	380	
	GCT TCA CAA TCA CAA GAA AGT GAA GAC TAT TCT CAG CCA TCA ACT TCT			1200
	Ala Ser Gln Ser Gln Glu Ser Glu Asp Tyr Ser Gln Pro Ser Thr Ser			
	385	390	395	400

AGT AGC ATT ATT TAT AGC AGC CAA GAA GAT GTG AAA GAG TTT GAA AGG 1248  
 Ser Ser Ile Ile Tyr Ser Ser Gln Glu Asp Val Lys Glu Phe Glu Arg  
 405 410 415

5

GAA GAA ACC CAA GAC AAA GAA GAG AGT GTG GAA TCT AGT TTG CCC CTT 1296  
 Glu Glu Thr Gln Asp Lys Glu Glu Ser Val Glu Ser Ser Leu Pro Leu  
 420 425 430

10

AAT GCC ATT GAA CCT TGT GTG ATT TGT CAA GGT CGA CCT AAA AAT GGT 1344  
 Asn Ala Ile Glu Pro Cys Val Ile Cys Gln Gly Arg Pro Lys Asn Gly  
 435 440 445

15

TGC ATT GTC CAT GGC AAA ACA GGA CAT CTT ATG GCC TGC TTT ACA TGT 1392  
 Cys Ile Val His Gly Lys Thr Gly His Leu Met Ala Cys Phe Thr Cys  
 450 455 460

20

GCA AAG AAG CTA AAG AAA AGG AAT AAG CCC TGC CCA GTA TGT AGA CAA 1440  
 Ala Lys Lys Leu Lys Lys Arg Asn Lys Pro Cys Pro Val Cys Arg Gln  
 465 470 475 480

25

CCA ATT CAA ATG ATT GTG CTA ACT TAT TTC CCC TAG 1476  
 Pro Ile Gln Met Ile Val Leu Thr Tyr Phe Pro \*  
 485 490

(3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:



- (A) LONGUEUR: 1182 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

5

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON

10

- (ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: CDS
- (B) EMPLACEMENT: 1..1182

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: ?:

15

ATG GAG GAG CCG CAG TCA GAT CCT AGC GTC GAG CCC CCT CTG AGT CAG 48  
 Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln  
 1 5 10 15

20 GAA ACA TTT TCA GAC CTA TGG AAA CTA CTT CCT GAA AAC AAC GTT CTG 96  
 Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu  
 20 25 30

TCC CCC TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GAT TTG ATG CTG TCC CCG GAC 144  
 25 Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp  
 35 40 45

GAT ATT GAA CAA TGG TTC ACT GAA GAC CCA GGT CCA GAT GAA GCT CCC 192  
 Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro

	50		55		60	
	AGA ATG CCA GAG GCT GCT CCC CCC GTG GCC CCT GCA CCA GCA GCT CCT					240
	Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro					
5	65		70		75	80
	ACA CCG GCG GCC CCT GCA CCA GCC CCC TCC TGG CCC CTG TCA TCT TCT					288
	Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser					
		85		90		95
10						
	GTC CCT TCC CAG AAA ACC TAC CAG GGC AGC TAC GGT TTC CGT CTG GGC					336
	Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly					
		100		105		110
15	TTC TTG CAT TCT GGG ACA GCC AAG TCT GTG ACT TGC ACG TAC TCC CCT					384
	Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro					
		115		120		125
	GCC CTC AAC AAG ATG TTT TGC CAA CTG GCC AAG ACC TGC CCT GTG CAG					432
20	Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln					
		130		135		140
	CTG TGG GTT GAT TCC ACA CCC CCG CCC GGC ACC CGC GTC CGC GCC ATG					480
	Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met					
25	145		150		155	160
	GCC ATC TAC AAG CAG TCA CAG CAC ATG ACG GAG GTT GTG AGG CGC TGC					528
	Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys					
		165		170		175

CCC CAC CAT GAG CGC TGC TCA GAT AGC GAT GGT CTG GCC CCT CCT CAG 576  
 Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln  
 180 185 190

5

CAT CTT ATC CGA GTG GAA GGA AAT TTG CGT GTG GAG TAT TTG GAT GAC 624  
 His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp  
 195 200 205

10

AGA AAC ACT TTT CGA CAT AGT GTG GTG GTG CCC TAT GAG CCG CCT GAG 672  
 Arg Asn Thr Phe Arg His Ser Val Val Val Pro Tyr Glu Pro Pro Glu  
 210 215 220

15

GTT GGC TCT GAC TGT ACC ACC ATC CAC TAC AAC TAC ATG TGT AAC AGT 720  
 Val Gly Ser Asp Cys Thr Thr Ile His Tyr Asn Tyr Met Cys Asn Ser  
 225 230 235 240

20

TCC TGC ATG GGC GGC ATG AAC CGG AGG CCC ATC CTC ACC ATC ATC ACA 768  
 Ser Cys Met Gly Gly Met Asn Arg Arg Pro Ile Leu Thr Ile Ile Thr  
 245 250 255

25

CTG GAA GAC TCC AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG 816  
 Leu Glu Asp Ser Ser Gly Asn Leu Leu Gly Arg Asn Ser Phe Glu Val  
 260 265 270

CGT GTT TGT GCC TGT CCT GGG AGA GAC CGG CGC ACA GAG GAA GAG AAT 864  
 Arg Val Cys Ala Cys Pro Gly Arg Asp Arg Arg Thr Glu Glu Glu Asn  
 275 280 285

	CTC CGC AAG AAA GGG GAG CCT CAC CAC GAG CTG CCC CCA GGG AGC ACT	912
	Leu Arg Lys Lys Gly Glu Pro His His Glu Leu Pro Pro Gly Ser Thr	
	290 295 300	
5	AAG CGA GCA CTG CCC AAC AAC ACC AGC TCC TCT CCC CAG CCA AAG AAG	960
	Lys Arg Ala Leu Pro Asn Asn Thr Ser Ser Ser Pro Gln Pro Lys Lys	
	305 310 315 320	
	AAA CCA CTG GAT GGA GAA TAT TTC ACC CTT CAG ATC CGT GGG CGT GAG	1008
10	Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu	
	325 330 335	
	CGC TTC GAG ATG TTC CGA GAG CTG AAT GAG GCC TTG GAA CTC AAG GAT	1056
	Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp	
15	340 345 350	
	GCC CAG GCT GGG AAG GAG CCA GGG GGG AGC AGG GCT CAC TCC AGC CAC	1104
	Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His	
	355 360 365	
20		
	CTG AAG TCC AAA AAG GGT CAG TCT ACC TCC CGC CAT AAA AAA CTC ATG	1152
	Leu Lys Ser Lys Lys Gly Gln Ser Thr Ser Arg His Lys Lys Leu Met	
	370 375 380	
25	TTC AAG ACA GAA GGG CCT GAC TCA GAC TGA	1182
	Phe Lys Thr Glu Gly Pro Asp Ser Asp *	
	385 390	

### REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un composé capable d'antagoniser au moins partiellement l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers à contexte p53 nul.
- 5        2. Utilisation selon la revendication 1 d'un composé capable de se lier au niveau du domaine 1-134 de la séquence de la protéine Mdm2 représentée en SEQ ID N° 1.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que le composé est un scFV dirigé contre le domaine 1-134 de ladite protéine Mdm2.
- 10       4. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2 caractérisé en ce que le composé est représenté en tout ou partie par un des peptides 1-52, 1-41, 6-41, 16-25, 18-23 de la séquence représentée en SEQ ID N°2 ou de leurs dérivés.
5. Utilisation selon la revendication 1 d'un composé capable de se lier à un domaine voisin du domaine 1-134 représenté en SEQ ID N° 1 de la protéine Mdm2 et
- 15       affectant de part cette liaison l'activité oncogénique de ladite protéine.
6. Utilisation selon la revendication 1 ou 5 caractérisé en ce que le composé interagit avec le domaine C terminal de la protéine Mdm2.
7. Utilisation selon la revendication 1, 5 ou 6 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un facteur transcriptionnel choisi parmi TFII, TBP et TAF250.
- 20       8. Utilisation selon la revendication 1 ou 5 caractérisé en ce que le composé interagit avec le domaine 135-491 de la protéine Mdm2.
9. Utilisation selon la revendication 1, 5 ou 8 caractérisé en ce qu'il s'agit en tout ou partie d'une protéine choisie parmi les protéines Rb, L5 et le facteur transcriptionnel E2F.

10. Utilisation d'un scFV dirigé contre le domaine 1-134 de la protéine Mdm2 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers.

5 11. Utilisation d'un acide nucléique codant pour un composé capable d'antagoniser l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des cancers à contexte p53 nul.

12. Utilisation selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'il s'agit de :

- d'acides nucléiques antisens,
- d'oligonucléotides ligands capables de fixer directement l'un des domaines de  
10 la protéine Mdm2 et d'inhiber son activité oncogénique,
- d'acides nucléiques codant en tout ou partie pour des peptides ou protéines capables de s'oligomériser avec l'un des domaines de Mdm2 et d'inhiber son activité oncogénique,
- d'acides nucléiques codant pour des anticorps intracellulaires dirigés contre le  
15 domaine 1-134 de la séquence de la protéine Mdm2 représentée en SEQ ID N°1.

13. Utilisation selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'acide nucléique antisens est un ADN codant pour un ARN complémentaire de l'acide nucléique codant pour la protéine Mdm2 et capable de bloquer sa transcription et/ou sa traduction (ARN antisens) ou un ribozyme.

20 14. Utilisation selon l'une des revendications 11 à 13 caractérisée en ce que l'acide nucléique est utilisé sous forme complexée avec du DEAE-dextran, avec des protéines nucléaires, ou avec des lipides ou polymères cationiques, sous forme de liposomes ou encore tel quel.

25 15. Utilisation selon l'une des revendications 11 à 13 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur.

16. Utilisation selon la revendication 15 caractérisée en ce que l'acide nucléique fait partie d'un vecteur viral, choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus et les virus adéno-associés.

5 17. Vecteur viral comprenant une séquence d'acide nucléique codant pour un composé capable d'inhiber au moins partiellement l'activité oncogénique de la protéine Mdm2.

18. Vecteur viral selon la revendication 17 caractérisé en ce que la séquence d'acides nucléiques code pour un scFv ou un peptide capable d'interagir au niveau du domaine 1-134 (SEQ ID N°1) de la protéine Mdm2.

10 19. Vecteur viral selon la revendication 17 ou 18 caractérisé en ce qu'il est choisi parmi les adénovirus, les rétrovirus et les virus adéno-associés.

20. Vecteur viral selon les revendications 17 à 19 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus ou d'un rétrovirus.

15 21. Composition pharmaceutique comprenant un composé capable d'inhiber l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 tel que défini en revendications 1 à 11.

22 Composition pharmaceutique comprenant une séquence d'acides nucléiques codant pour un composé capable d'inhiber l'activité oncogénique de la protéine Mdm2 tel que défini en revendication 12 ou 13.

20 23. Composition pharmaceutique selon la revendication 22 caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un vecteur viral selon l'une des revendications 14 à 20.

24. Composition selon la revendication 23 formulée en vue d'une administration intra-tumorale.

25 25. Utilisation d'une séquence nucléique codant pour des anticorps intracellulaires, dirigés contre le domaine 1-134 (SEQ ID N°1) de la protéine Mdm2 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement du cancer.

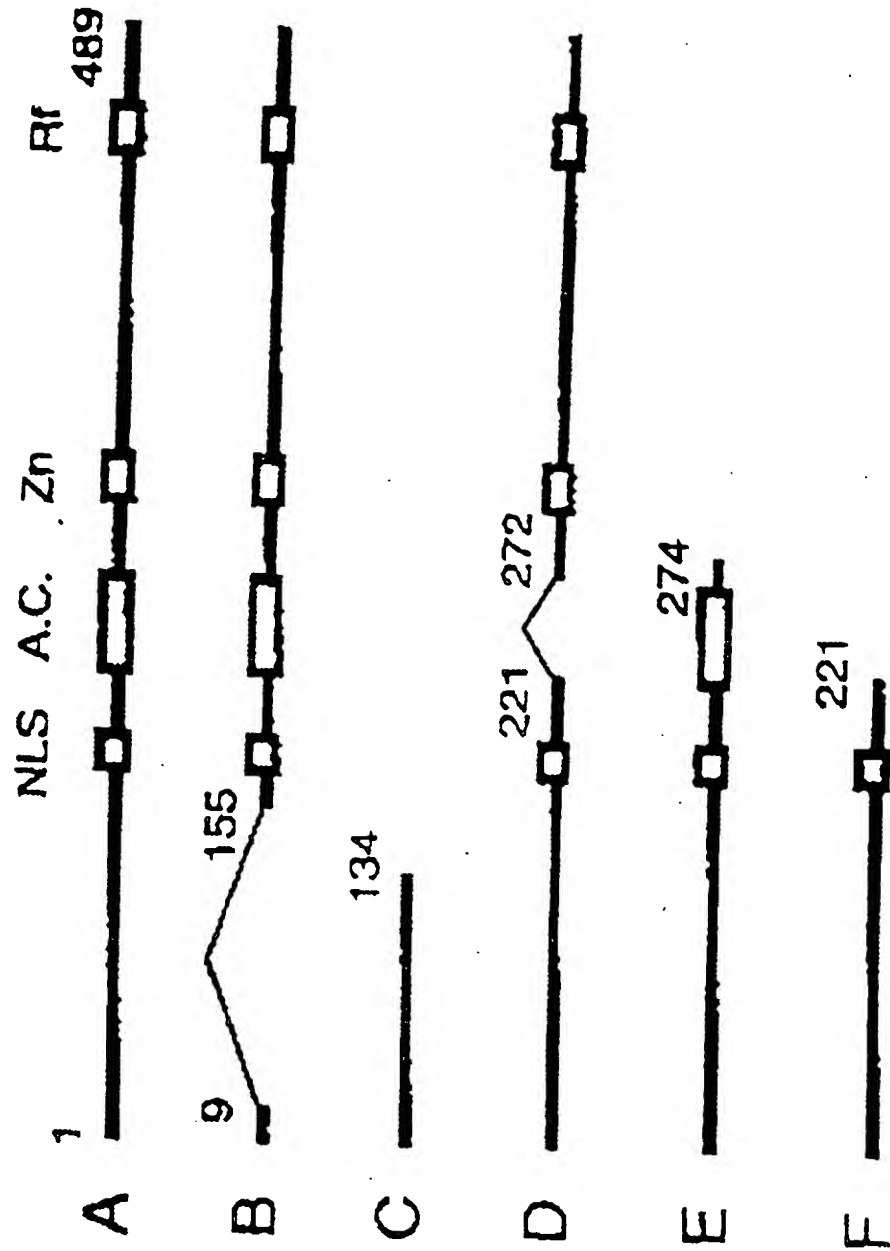


Figure 1



# Clones dans soft-agar

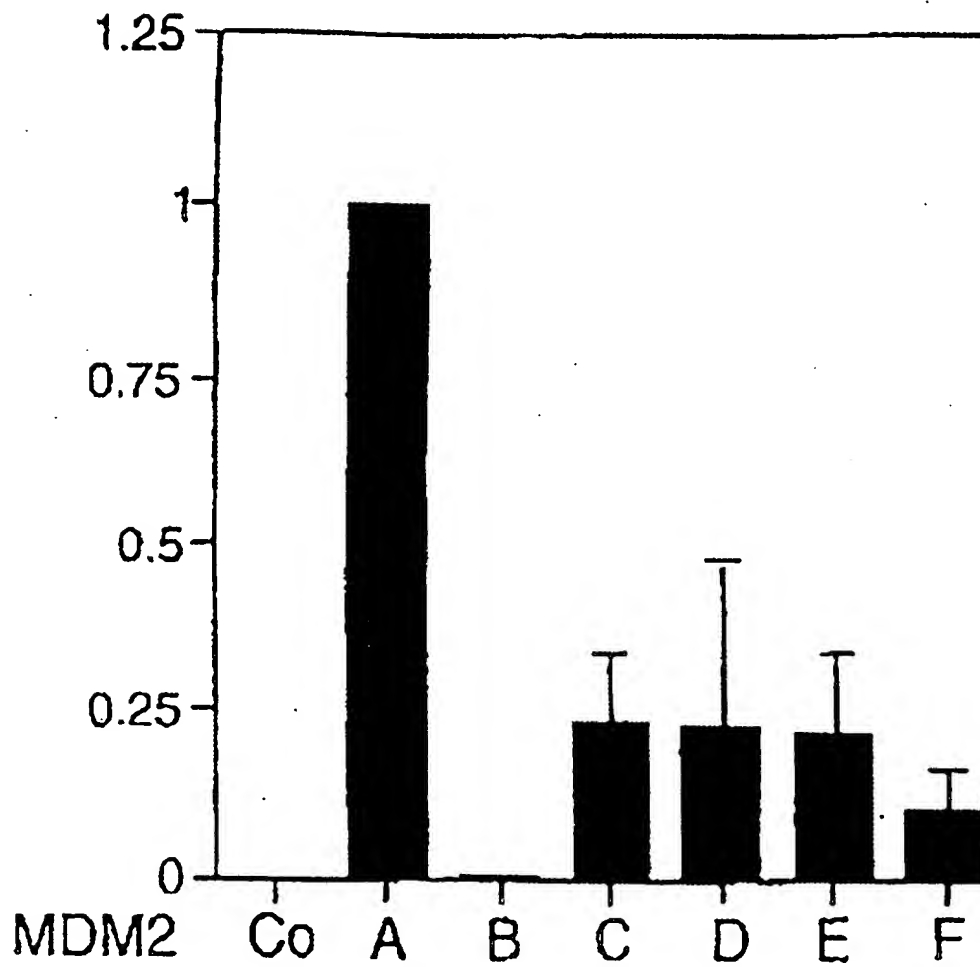


Figure 2

3/5

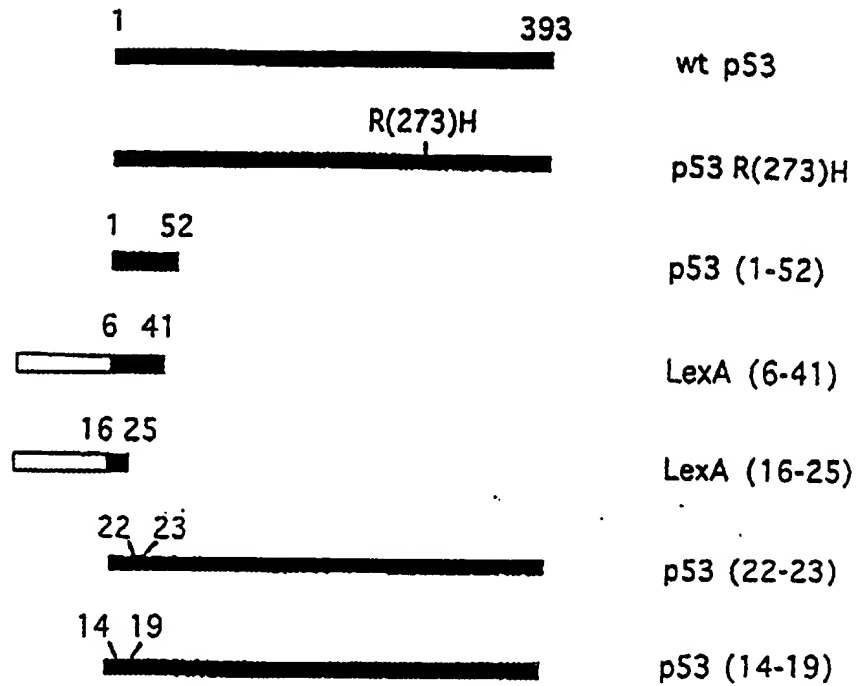


Figure 3a

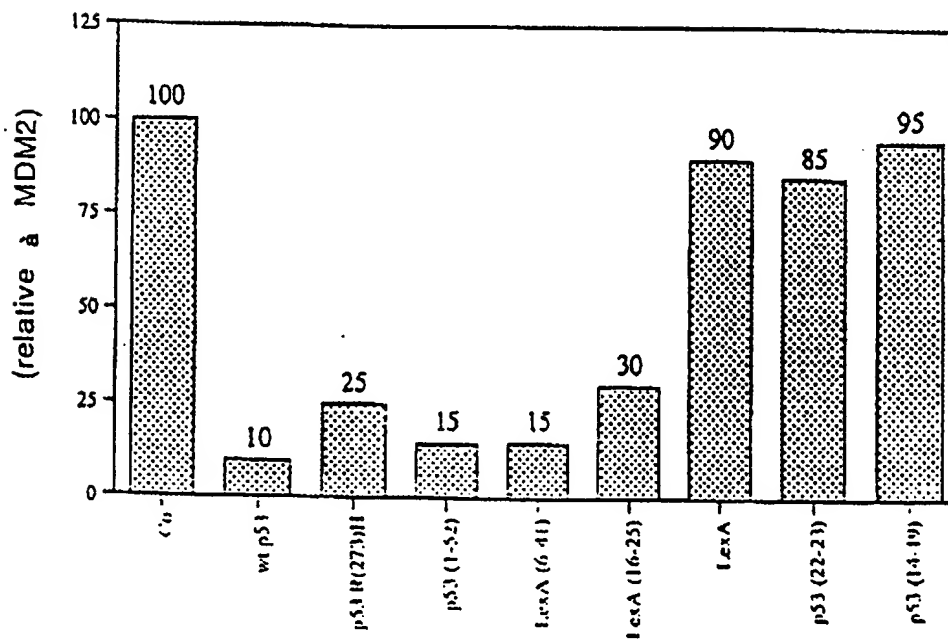


Figure 3b

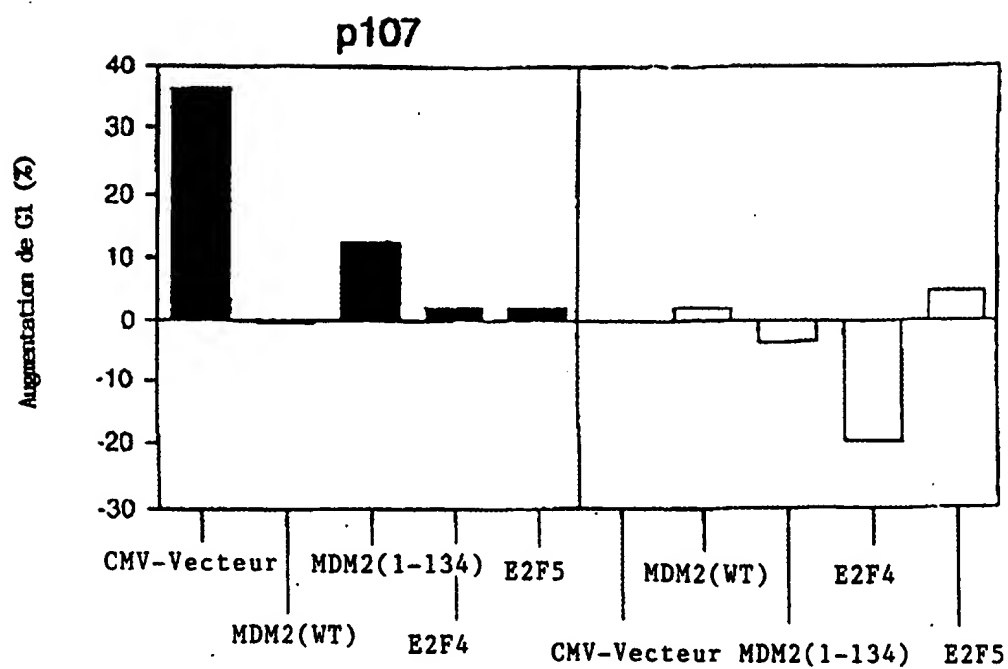


Figure 4

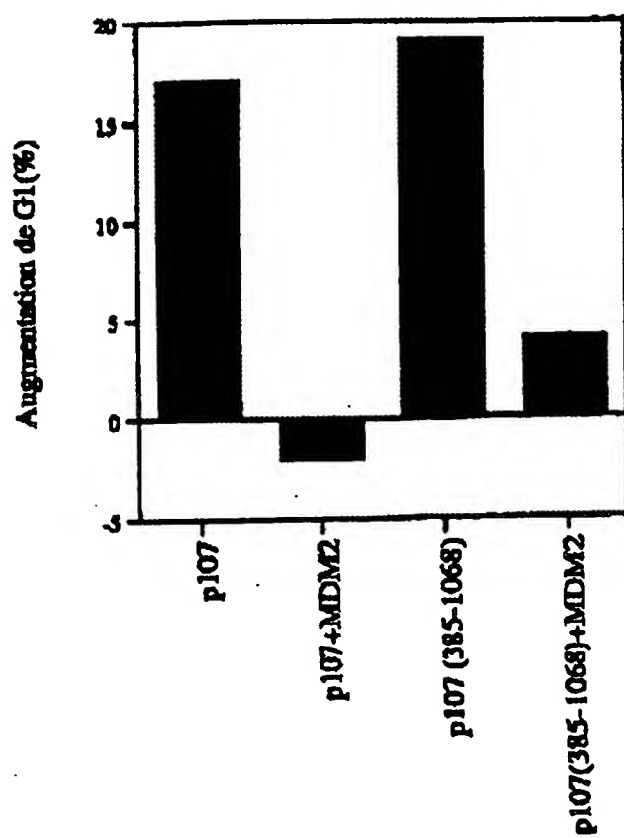


Figure 5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01340

A. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K38/17 A61K39/395 A61K31/70 C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 96 02642 A (UNIVERSITY OF DUNDEE) 1 February 1996 see page 11, line 19 - page 12, line 14 see page 4, line 15 - page 8, line 18 ---	1,2,4
X	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 6, no. 1, January 1995, pages 251-259, XP002004851 PING LENG ET AL.: "HUMAN ONCOPROTEIN MDM2 INTERACTS WITH THE TATA-BINDING PROTEIN IN VITRO AND IN VIVO" see the whole document --- -/-	1,6,7

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 1997

Date of mailing of the international search report

25.04.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Rempp, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 96/01340

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, no. SUPPLEMENT 19A, 5 - 26 January 1995, page 54 XP000572208 THIERRY LAVEILLARD ET AL.: "THE ONCOPROTEIN MDM2 ASSOCIATES WITH THE TATA-BINDING PROTEIN (TBP)." see paragraph A1-329 ---	1,6,7
X	WO 93 20238 A (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 14 October 1993 see page 10, line 7 - page 11, line 25 ---	1,3,4, 12,13,22
X	WO 94 29446 A (RHONE-POULENC RORER SA ;SCHWEIGHOFFER FABIEN (FR); TOCQUE BRUNO (F) 22 December 1994 cited in the application see page 2, line 22 - page 5, line 25 ---	17-20,22
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 7, July 1993, pages 4107-4114, XP000571629 JIANDONG CHEN ET AL.: "MAPPING OF THE P53 AND MDM-2 INTERACTION DOMAINS." see the whole document -----	1-3,10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/FR 96/01340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9602642 A	01-02-96	AU 2987695 A CA 2195533 A	16-02-96 01-02-96
WO 9320238 A	14-10-93	US 5411860 A AU 4278893 A CA 2133306 A EP 0635068 A JP 7505294 T US 5420263 A US 5550023 A US 5519118 A US 5606044 A	02-05-95 08-11-93 14-10-93 25-01-95 15-06-95 30-05-95 27-08-96 21-05-96 25-02-97
WO 9429446 A	22-12-94	FR 2706486 A AU 7076394 A BR 9407512 A CA 2165458 A CN 1126491 A CZ 9503295 A EP 0703980 A FI 956057 A JP 8511162 T NO 955011 A PL 312213 A SK 156895 A ZA 9404303 A	23-12-94 03-01-95 07-01-97 22-12-94 10-07-96 13-03-96 03-04-96 15-12-95 26-11-96 11-12-95 01-04-96 08-05-96 14-02-95

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No  
PCT/FR 96/01340

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 A61K38/17 A61K39/395 A61K31/70 C12N15/63		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X,P	WO 96 02642 A (UNIVERSITY OF DUNDEE) 1 Février 1996 voir page 11, ligne 19 - page 12, ligne 14 voir page 4, ligne 15 - page 8, ligne 18 ---	1,2,4
X	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 6, no. 1, Janvier 1995, pages 251-259, XP002004851 PING LENG ET AL.: "HUMAN ONCOPROTEIN MDM2 INTERACTS WITH THE TATA-BINDING PROTEIN IN VITRO AND IN VIVO" voir le document en entier ---	1,6,7
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  15 Avril 1997		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  25.04.97
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Rempp, G



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No  
PCT/FR 96/01340

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, no. SUPPLEMENT 19A, 5 - 26 Janvier 1995, page 54 XP000572208 THIERRY LAVEILLARD ET AL.: "THE ONCOPROTEIN MDM2 ASSOCIATES WITH THE TATA-BINDING PROTEIN (TBP)." voir alinéa A1-329 ---	1,6,7
X	WO 93 20238 A (THE JOHN HOPKINS UNIVERSITY) 14 Octobre 1993 voir page 10, ligne 7 - page 11, ligne 25 ---	1,3,4, 12,13,22
X	WO 94 29446 A (RHONE POULENC RORER SA ;SCHWEIGHOFFER FABIEN (FR); TOCQUE BRUNO (F) 22 Décembre 1994 cité dans la demande voir page 2, ligne 22 - page 5, ligne 25 ---	17-20,22
A	MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 7, Juillet 1993, pages 4107-4114, XP000571629 JIANDONG CHEN ET AL.: "MAPPING OF THE P53 AND MDM-2 INTERACTION DOMAINS." voir le document en entier -----	1-3,10

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Des 'e Internationale No

PCT/FR 96/01340

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9602642 A	01-02-96	AU 2987695 A CA 2195533 A	16-02-96 01-02-96
WO 9320238 A	14-10-93	US 5411860 A AU 4278893 A CA 2133306 A EP 0635068 A JP 7505294 T US 5420263 A US 5550023 A US 5519118 A US 5606044 A	02-05-95 08-11-93 14-10-93 25-01-95 15-06-95 30-05-95 27-08-96 21-05-96 25-02-97
WO 9429446 A	22-12-94	FR 2706486 A AU 7076394 A BR 9407512 A CA 2165458 A CN 1126491 A CZ 9503295 A EP 0703980 A FI 956057 A JP 8511162 T NO 955011 A PL 312213 A SK 156895 A ZA 9404303 A	23-12-94 03-01-95 07-01-97 22-12-94 10-07-96 13-03-96 03-04-96 15-12-95 26-11-96 11-12-95 01-04-96 08-05-96 14-02-95